

第 83 回麻布獣医学会 一般演題 12

家庭犬の口腔細胞からの DNA サンプル調整法と ヨークシャーテリアのメラノコルチン 1 レセプター 遺伝子の単離と同定

本田三緒子¹, 岡野 桂樹², 小黒一岡野美枝子¹

¹ヤマザキ動物看護短期大学, ²秋田県立大学

家庭犬のゲノム DNA は、血統管理のための DNA 鑑定や獣医学・分子生物学研究の学術面において犬の遺伝子・ゲノム材料として重要である。本研究では、大型犬、中型犬、小型犬、日本犬、西洋犬など異なる家庭犬から口腔内細胞を採取し、塩基配列忠実度の高いゲノム DNA 標品を、簡便に収量多く調整する方法を確立した。さらにゲノム DNA 標品より、毛色に関与するメラノコルチン 1 レセプター (*Mclr*) 遺伝子の単離同定を行った。

[方法]

犬種には秋田犬 (大型犬), ラブラドルレトリバー (中型犬), スコティッシュテリア (小型犬), ヨークシャーテリア (小型犬) を選んだ。4 犬種それぞれについて、複数の個体から、綿棒を用いて口腔内細胞を採取した。ゲノム DNA 抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を本研究に適合するように一部改変し、使用した。次に得られた DNA 1 μ l から、GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences) により増幅したのち、精製し、PCR に用いた。DNA 標品の収量および純度は、NanoDrop 分光光度計のスキャン測定、およびアガロース電気泳動法で確認した。

得られた DNA 標品のうち、毛色がスチールブルー

であるヨークシャーテリアの DNA を用いて、*Mclr* 遺伝子を PCR 法により単離した。PCR プライマーは、完全な ORF と 5' 非翻訳領域と、終始コドンより 3' 下流の非翻訳領域を含む 1.3 kb の PCR フラグメントの両端の配列である。iProofDNA polymerase (Bio-Rad) を用いてアニーリング温度 66 °C で PCR 増幅し、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。
[結果と考察]

大型犬、中型犬、小型犬のすべての犬種で、滅菌綿棒 1 本でも口腔内細胞を採取し遺伝子クローニングやマイクロサテライト解析に使用可能な DNA 標品を手軽に大量に調整する方法を確立した。また、そのゲノム DNA 標品により NCBI GenBank のデータ (ボクサー犬) と 1 箇所の塩基置換 (V264M) もつ外は一致した塩基配列をもつゲノム *Mclr* 遺伝子を単離できた。

この DNA 調整法は、家庭犬における遺伝子クローニングの出発材料に適合する DNA 標品を簡易に得られる方法であり、また、マイクロサテライト解析による DNA 鑑定などにも有用である。今後は、臨床獣医学的知見への応用が期待される。